

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 728 905

21 N° d'enregistrement national : 94 15838

51 Int Cl⁶ : C 07 K 14/32, C 12 N 15/55, 1/21, C 12 P 21/02, 7/40

CETTE PAGE ANNULE ET REMPLACE LA PRECEDENTE

12 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

22 Date de dépôt : 29.12.94.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 05.07.96 Bulletin 96/27.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : RHONE POULENC NUTRITION
ANIMALE — FR.

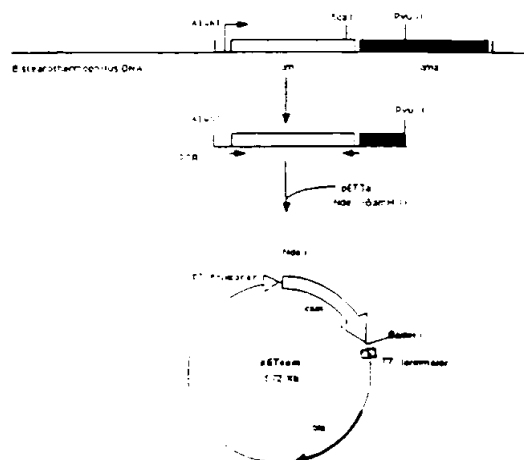
72 Inventeur(s) : DION MICHEL, BATISSE NADINE,
WEIGEL PIERRE, LECOCQ FRANCOISE MICHELE,
HALLET JEAN NOEL et SAKANYAN VEHARY.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire : RHONE POULENC RORER SA.

54 NOUVELLE ACIDE AMINE AMIDOHYDROLASE, SEQUENCE NUCLOTIDIQUE CORRESPONDANT ET LEURS
UTILISATIONS.

57 La présente invention concerne une nouvelle acide
aminé amidohydrolase, la séquence nucléotidique corres-
pondante, les vecteurs et cellules correspondantes et l'utili-
sation de cette enzyme pour l'hydrolyse stéréosélective de
dérivés N-acylés L-acides aminés.



FR 2 728 905 - A1



NOUVELLE ACIDE AMINE AMIDOHYDROLASE SEQUENCE
NUCLEOTIDIQUE CORRESPONDANTE ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention concerne une nouvelle acide aminé amidohydrolase, la
5 séquence nucléotidique codant pour cette enzyme, des plasmides d'expression
correspondants et l'utilisation de cette enzyme.

Les acides aminés amidohydrolases sont des enzymes responsables chez les
plantes, les animaux et les microorganismes de l'hydrolyse des résidus acyles des
acides aminés. C'est ainsi que l'acétylornithine déacétylase catalyse la conversion de la
10 N²-acétyl L-ornithine en L-ornithine dans le processus de biosynthèse de l'arginine
chez certaines bactéries. De par leur spécificité énantiomérique, ces enzymes sont
particulièrement intéressantes sur le plan industriel et sont notamment utilisées à ce
titre pour la production sélective de stéréoisomères à partir de mélanges racémiques.

Malheureusement, ces acides aminés amidohydrolases possèdent très souvent
15 des spécificités étroites de substrat, de température et/ ou de pH qui empêchent leur
utilisation de manière très générale. Par exemple, une souche d'*Escherichia coli*
comportant le gène codant pour l'acétylornithine déacétylase est incapable
d'hydrolyser des dérivés d'acides aminés aromatiques N-acylés.

Récemment, la Demanderesse a découvert et caractérisé, sur un fragment
20 d'ADN de la souche *Bacillus stearothermophilus* NCIB8224, la présence d'un gène
aminoacylase codant pour une acide aminé amidohydrolase hydrolysant des motifs N-
acétyl des L-acides aminés (V.Sakanyan et al. 1993, *Applied and Environmental*
Microbiology 59(11), 3878-3888.). Cette enzyme est thermostable et possède
avantageusement un optimum d'activité à 70°C. Outre cette qualité, elle hydrolyse
25 efficacement une grande variété de N-acyl L-acides aminés, comme N-acétyl, N-
formyle, N-chloracetyl, mais pas N-carbamoyl.

La présente invention a précisément pour objet de proposer une nouvelle
acide aminé amidohydrolase avantageusement stéréospécifique et thermostable,
efficace vis à vis d'acides aminés N-carbamoylés.

30 Dans le cadre de la présente invention, la demanderesse a localisé et
caractérisé en amont du gène codant pour l'aminoacylase ci-avant, un second cadre de

lecture correspondant à une séquence nucléotidique codant pour une seconde acide aminé amidohydrolase. Il s'agit plus précisément d'une acide aminé amidohydrolase spécifique de l'hydrolyse des motifs N-carbamoyle des L-acides aminés, que nous appellerons ci-après carbamoylase ; le gène correspondant sera désigné *cam*.

- 5 La présente invention a pour premier objet une carbamoylase exprimée par la souche *Bacillus stearothermophilus* NCIB 8224 et capable d'hydrolyser des motifs N-carbamoyle des L-acides aminés.

- Elle décrit en particulier l'isolement et la caractérisation du gène codant pour une telle enzyme. Ce gène a été cloné, séquencé et exprimé chez *E. coli* et son activité enzymatique caractérisée.
- 10

La présente invention concerne plus particulièrement une carbamoylase caractérisée en ce qu'elle possède la séquence d'acides aminés représentée en SEQ ID N°1.

- La comparaison de cette séquence avec des séquences disponibles sur base de données a permis de mettre en évidence des homologies significatives avec respectivement la séquence codant pour l'amidohydrolase des N-carbamoyle des L-acides aminés de la souche *Pseudomonas* sp. NS671 (Watabe et al.; 1992, *Journal of Bacteriology* 174(3), 962-969) et la séquence codant pour la carbamoylase de la souche *Bacillus stearothermophilus* NS112A (Mukohara et al. 1993, *Biosci. Biotech. Biochem* 57(11), 1935-1937.) et d'établir ainsi son activité carbamoylase.
- 15
- 20

La carbamoylase revendiquée est avantageusement active à une température de l'ordre de 55°C et présente une L-stéréospécificité.

La présente invention a également pour objet une séquence nucléotidique codant pour une carbamoylase selon l'invention.

- 25 Plus précisément, il s'agit de la séquence nucléotidique représentée en SEQ ID N°1. De préférence, elle est de l'ordre de 1,2 kb.

Un autre objet de la présente invention concerne un ADN recombinant comprenant au moins une séquence nucléotidique telle que revendiquée.

Selon un mode préféré de l'invention, la séquence nucléotidique ci-avant fait partie d'un vecteur d'expression qui peut être à répllication autonome ou intégratif.

L'invention a également pour objet toute cellule recombinante contenant une séquence nucléotidique et/ou un vecteur tels que définis ci-avant. Les cellules
5 recombinantes selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO,
10 C127, les oeufs de Xénope, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Micromonospora*, *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. De préférence, il s'agit de cellules procaryotes. A ce titre on peut plus particulièrement utiliser les bactéries suivantes *Actinomycètes*, *Bacillus* et *Staphylococcus*, et plus préférentiellement *E.coli*. Les cellules recombinantes de l'invention peuvent être
15 obtenues par toute méthode permettant d'introduire une séquence nucléotidique étrangère dans une cellule. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, fusion de protoplastes, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation de la
20 carbamoylase revendiquée à partir de la culture d'une de ces cellules recombinantes. La carbamoylase ainsi obtenue, est récupérée selon des méthodes classiques à l'issue de la culture. Selon un mode particulier de ce procédé, l'expression du gène codant pour la carbamoylase de *B. stearothermophilus* NCIB 8224 est placée sous contrôle d'un promoteur du bactériophage T7. Il en résulte une expression nettement améliorée
25 de l'enzyme. Elle est environ 1000 fois plus importante que dans la souche d'*E. coli* contenant un plasmide recombinant avec le gène de la carbamoylase mais sans le système d'expression T7.

La présente invention vise également un procédé enzymatique pour
30 hydrolyser des N-carbamoyle L-acides aminés en L-acides aminés correspondants mettant en oeuvre une carbamoylase selon l'invention exprimée *in situ* ou non à partir d'une cellule comportant au moins un gène selon l'invention.

Selon un mode particulier de ce procédé, l'hydrolyse est conduite en présence de sels métalliques et plus préférentiellement de sels de cobalt. Ce mode de réalisation est décrit plus en détail en exemple 3 ci-après.

5 La carbamoylase selon l'invention est tout particulièrement utile pour préparer de la L-méthionine.

Les exemples et la figure qui suivent, sont présentés à titre illustratif et non limitatif de la présente invention et mettent en évidence d'autres avantages de celle-ci.

FIGURE

Figure 1 : Construction du plasmide pETcam.

10

MATERIEL ET METHODES

A. Souches, plasmides et réactifs :

Les souches *E. coli* XS1D2 (Mountain *et al.*, 1984, *Molecular and General Genetics* 197 ; 82-89.) et JM101 (Yanish-Peron *et al.*, 1985, *Gene* 33 ; 103-109.) ont été
15 respectivement utilisées pour les constructions de pBC8 et du plasmide d'expression. La souche *E. coli* BL21 Ω (DE3) qui porte le gène T7 de l'ARN polymérase sous le contrôle du promoteur *lacUV5* dans son chromosome (Studier *et al.*, 1990, *Meth. Enzymol.* 185 ; 60-89.) est utilisée comme hôte d'expression. *B. stearothermophilus* NCIB8224 est une souche du laboratoire (qui provient elle-même de l'"All Union
20 Collection of Microorganisms", Moscou). Le vecteur d'expression pET3a a été obtenu auprès de Novagen (Studier *et al.*, 1990, *Meth. Enzymol.* 185 ; 60-89.). Les acides aminés N-carbamoylé sont de chez Sigma sauf les N-carbamoylé méthionine de série D, L-, D- et L- qui ont été synthétisées en laboratoire selon des protocoles classiques. Les enzymes de restriction, l'ADN ligase et l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) sont de chez Boehringer Mannheim. L'ADN Taq polymérase et les oligodéoxynucleotides sont de chez Eurogentec.
25

B. Construction de pETcam

Le plasmide d'expression pETcam est obtenu par clonage dans le vecteur pET3a du fragment correspondant à la région codant pour *cam*, amplifié par la
5 réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Sa construction est représentée schématiquement sur la figure 1.

Les séquences oligodéoxynucleotide 24-mer et 29-mer utilisées pour amplifier la région codant pour le gène *cam* sont 5'-AACATATGATTCAAGGGGAACGTC-3' et 5'-
10 GCGGATCCTCGTTTGTCTTTTTCGTTATT-3'. Des séquences supplémentaires 5'- sont présentes sur toutes les amorces et correspondent aux sites des enzymes de restriction. Le fragment d'ADN *cam* AlwN I-Pvu II du plasmide pBC8 (obtenu selon l'exemple1) a été utilisé pour l'amplification de la région codant pour le gène *cam*. Les
15 produits de la PCR sont isolés, leurs extrémités sont rendues franches à l'aide de la sous unité Klenow de l'ADN polymérase. Ils sont ensuite clonés dans le vecteur pUC18 lui même digéré par l'enzyme Sma I et déphosphorylé. Cette étape permet la digestion NdeI-BamHI de la région codant pour *cam* qui est ensuite clonée dans le vecteur d'expression pET3a prédigéré en NdeI-BamHI. On obtient ainsi pETcam.

20 C. Protocole d'identification de la protéine carbamoylase par SDS-PAGE

Des culots cellulaires provenant de 200 µl de milieu de culture sont resuspendus dans 100 µl de tampon (Laemmli *et al.*, 1970, *Nature* 227 ; 660-685) et soniqués. Classiquement, environ 10 µl (soit près de 20 µg de protéines totales) sont
25 disposés sur le gel. Après migration (3 h) les protéines sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie.

D. Méthode pour évaluer l'activité carbamoylase

Des culots cellulaires provenant de 0,5 ml de culture sont resuspendus dans le même volume de tampon Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) et lysés par sonication pendant 10 minutes. Classiquement 10 µl (environ 10 µg de protéines totales) de la
30 suspension ainsi obtenue sont utilisés pour doser l'activité enzymatique dans un volume de 200 µl. La réaction se fait en présence de tampon phosphate (50 mM, pH 7,5), CoCl₂ (1 mM) et de substrat N.carabamoyl D, L-méthionine 50 mM. Après

- 15-20 minutes d'incubation à 55°C la réaction est arrêtée en ajoutant 100 µl d'H₃PO₄ 0,6 M. L'activité carbamoylase est évaluée en quantifiant la méthionine produite lors de la réaction, après séparation du milieu réactionnel en phase inverse (colonne Kontron, Sphérisorb S5 ODS 2, 250x5 mm) par HPLC (Système Kontron comprenant un passeur d'échantillons, autosampler 460 : injection de 20 µl, une pompe, Pump 420 et Gradient former 425). L'élution est réalisée en présence du mélange Méthanol-H₃PO₄ (100 mM)/10%-90% (v/v). La détection des produits se fait à 215 nm (Déecteur, UVIKON 740 LC). Une gamme d'étalonnage permet d'estimer la quantité de méthionine formée en fonction de la surface des pics. En présence de substrats N-carbamoyl D, L-alanine ou N-carbamoyl D, L-leucine, l'alanine et la leucine sont quantifiées par dosage colorimétrique (réactif à la ninhydrine : la coloration est obtenue à 70°C, température à laquelle le substrat N-carbamoyl ne réagit pas avec le réactif utilisé).

E. Séquencage de l'ADN

- 15 Le séquencage de l'ADN codant pour la carbamoylase a été effectué selon la méthode de Sanger (Sanger, 1981, *Science*, 214, 1205-1210).

EXEMPLE I

- 20 - Isolement et détermination de la séquence du gène codant pour la carbamoylase revendiquée.

- 25 L'ADN génomique de la souche de *B. stearothermophilus* NCIB 8224 a été digéré par l'enzyme PstI puis ligaturé avec le vecteur pBR322 digéré par la même enzyme. Après transformation d'*E. coli* XS1D2, les clones ont été sélectionnés par croissance sur milieu synthétique avec tétracycline sans arginine. Tous les plasmides recombinants contenaient un fragment d'ADN de *B.stearothermophilus* de 4,7 kb. L'un d'entre eux a été désigné pBC8. Un sous-fragment de 1230 pb contenant l'intégralité de la séquence codante de la carbamoylase a été séquencé. La séquence est présentée en SEQ ID N°1. La carbamoylase est composée de 409 acides aminés et présente un poids moléculaire attendu de 44 202 daltons.

EXEMPLE 2

- Surexpression du gène carbamoylase

Une préculture de *E. coli* BL21 Ω (DE3) portant le plasmide pETcam est incubée à 37°C dans un milieu LB contenant de l'ampicilline (100 μ g/ml). 0,2 ml de cette culture sont utilisés pour inoculer 20 ml du même milieu. Lorsque la DO_{600 nm} atteint environ 3,0, l'expression de l'ARN polymérase T7 est induite avec 0,1 mM d'IPTG. La culture induite est poursuivie pendant 4 heures supplémentaires. La culture est centrifugée à 12 000 g pendant 3 minutes. Les culots de cellules sont conservées à - 20°C. L'activité enzymatique carbamoylase est appréciée selon la méthode décrite au point D précédent.

Le tableau I ci-après rend compte des résultats obtenus. A titre comparatif y sont également présentées les activités enzymatiques obtenues avec différentes souches contenant ou non le gène *cam*.

	Addition d'IPTG	Activité Carbamoylase μ mol de L-méth/h/mg protéine
<i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i> NCIB 8224	-	0,15
<i>E. coli</i> XS1D2	-	non détectable
<i>E. coli</i> XS1D2 (pBC8)	-	0,4
<i>E. coli</i> BL21 Ω (DE3)	-	non détectable
<i>E. coli</i> BL2152 Ω (DE3) (pETcam)	- +	200 505

TABLEAU I :

De ces résultats, il ressort les faits suivants: l'activité détectée dans la souche *B. stearothermophilus* NCIB 8224 cultivée à 55°C en milieu LB est très faible. Les souches d'*E. coli* XS1D2 et BL21 Ω (DE3) ne présentent aucune activité carbamoylase. La souche XS1D2 (pBC8) possède une activité faible mais supérieure à celle détectée chez *B. stearothermophilus* NCIB 8224. L'expression du gène *cam* par

le système T7 dans la souche BL21Q(DE3) (pETcam) fournit une activité beaucoup plus importante, atteignant 505 μmol L-méthionine/h/mg de protéine lorsque la T7 polymérase est induite. En absence d'induction, le niveau d'activité est assez conséquent en raison de la fuite d'expression du gène de la polymérase T7, entraînant ainsi l'expression du gène codant pour la carbamoylase.

La surexpression du gène *cam* dans la souche BL21Q(DE3) pETcam a été confirmée par l'analyse des protéines totales sur gel de PAGE SDS. Une bande majoritaire correspondant à environ 30 % des protéines totales (analyse densitométrique), possède un poids moléculaire de 44 Kda, en accord avec les données de la séquence de la carbamoylase.

EXEMPLE 3

Caractéristiques enzymatiques de la carbamoylase

La souche *E. coli* BL21Q(DE3)(pETcam) présentant une forte activité carbamoylase a été utilisée pour toutes les analyses enzymatiques. Les tests ont été effectués avec l'enzyme non purifiée présente dans les extraits bactériens.

La stéréospécificité de l'enzyme a été testée avec les énantiomères de la N-carbamoyl méthionine. L'activité a été trouvée pour la N-carbamoyl L-méthionine mais pas pour la N-carbamoyl D-méthionine. La carbamoylase est donc une enzyme strictement L-stéréospécifique vis-à-vis de la N-carbamoyl-méthionine.

L'enzyme peut également hydrolyser d'autres substrats; l'activité estimée en présence de la N-carbamoyl D,L-alanine et de la N-carbamoyl D,L-leucine représente respectivement 132 % et 25 % de l'activité envers la N-carbamoyl D,L-méthionine.

L'activité de la carbamoylase est augmentée d'au moins 5 fois en présence d'ions cobalt (1 mM) dans le mélange réactionnel par comparaison avec un témoin sans cobalt. L'activité de la carbamoylase est maximale à 55-60°C ce qui est caractéristique des enzymes thermostables.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE :

- 5 (i) DEPOSANT:
 (A) NOM : RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE
 (B) RUE : 42, avenue Aristide BRIAND
 (C) VILLE : ANTONY
 (E) PAYS : FRANCE
 10 (F) CODE POSTAL : 92160
 (ii) TITRE DE L' INVENTION : NOUVELLE AMINO ACIDE AMIDOHYDROLASE,
 SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE CORRESPONDANTE ET UTILISATIONS.
 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1
 (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR :
 15 (A) TYPE DE SUPPORT : Tape
 (B) ORDINATEUR : IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION : PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL : PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 (A) LONGUEUR : 1230 paires de bases
 (B) TYPE : acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS : double
 (D) CONFIGURATION : linéaire
 25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
 (iii) ANTI-SENS: NON
 (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: *Bacillus stearothermophilus*
 30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:
 35 Met Ile Gln Gly Glu Arg Leu Trp Gln Arg Leu Met Glu Leu Gly Glu
 TTG ATT CAA GGG GAA CGT CTT TGG CAA CGG CTC ATG GAA CTA GGG GAG
 9 18 27 36 45
 40 Val Gly Lys Gln Pro Ser Gly Gly Val Thr Arg Leu Ser Phe Thr Ala Glu Glu
 GTC GGC AAG CAA CCA AGC GGC GGC GTC ACG CGC CTC TCG TTC ACT GCT GAA GAG
 57 66 75 84 93 102

5	Arg CGG	Arg CGG	Ala GCC 111	Lys AAA	Asp GAT	Leu CTC 120	Val GTC	Ala GCT	Ser TCC 129	Tyr TAC	Met ATG	Arg CGC 138	Glu GAA	Ala GCC	Gly GGG 147	Leu CTT	Phe TTC	Val GTA 156
10	Tyr TAT	Glu GAA	Asp GAC 165	Ala GCG	Ala GCT	Gly GGC 174	Asn AAC	Leu TTG	Ile ATC 183	Gly GGA	Arg CGG	Lys AAA 192	Glu GAA	Gly GGG	Thr ACG 201	Asn AAT	Pro CCG	Asp GAT 210
15	Ala GCC	Thr ACG	Val GTC 219	Val GTC	Leu CTT	Val GTT 228	Gly GGA	Ser TCT	His CAT 237	Leu CTC	Asp GAT	Ser TCG 246	Val GTT	Tyr TAC	Asn AAC 255	Gly GGC	Gly GGC	Cys TGC 264
20	Phe TTT	Asp GAT	Gly GGA 273	Pro CCG	Leu CTC	Gly GGG 282	Val GTG	Leu TTG	Ala GCC 291	Gly GGC	Val GTG	Glu GAA 300	Val GTC	Val GTT	Gln CAG 309	Thr ACG	Met ATG	Asn AAC 318
25	Glu GAG	His CAC	Gly GGT 327	Val GTT	Val GTG	Thr ACG 336	His CAC	His CAC	Pro CCA 345	Ile ATT	Glu GAA	Val GTA 354	Val GTG	Ala GCG	Phe TTC 363	Thr ACT	Asp GAC	Glu GAA 372
30	Glu GAG	Gly GGA	Ala GCG 381	Arg CGC	Phe TTT	Arg CGT 390	Phe TTC	Gly GGC	Met ATG 399	Ile ATC	Gly GGC	Ser AGC 408	Arg CGC	Ala GCC	Met ATG 417	Ala GCC	Gly GGA	Thr ACA 426
35	Leu CTG	Pro CCG	Pro CCG 435	Glu GAA	Ala GCG	Leu CTC 444	Glu GAG	Cys TGC	Arg CGC 453	Asp GAC	Ala GCG	Glu GAA 462	Gly GGG	Ile ATT	Ser TCC 471	Leu CTC	Ala GCT	Glu GAA 480
40	Ala GCG	Met ATG	Lys AAA 489	Gln CAG	Ala GCG	Gly GGG 498	Leu CTT	Asp GAC	Pro CCG 507	Asp GAC	Arg CGC	Leu TTG 516	Pro CCG	Gln CAG	Ala GCA 525	Ala GCG	Arg CGA	Lys AAA 534
45	Pro CCA	Gly GGA	Thr ACG 543	Val GTG	Lys AAA	Ala GCC 552	Tyr TAT	Val GTC	Glu GAA 561	Leu TTG	His CAT	Ile ATC 570	Glu GAA	Gln CAA	Gly GGA 579	Arg CGG	Val GTG	Leu CTG 588
50	Glu GAG	Glu GAG	Ala GCT 597	Gly GGT	Leu CTT	Pro CCA 606	Val GTT	Gly GGC	Ile ATC 615	Val GTC	Thr ACT	Gly GGC 624	Ile ATC	Ala GCC	Gly GGT 633	Leu CTG	Ile ATT	Trp TGG 642
55	Val GTG	Lys AAA	Phe TTT 651	Thr ACC	Ile ATC	Ala GCC 660	Gly GGC	Pro CCG	Ala GCG 669	Glu GAA	His CAT	Ala GCC 678	Gly GGC	Ala GCC	Thr ACG 687	Pro CCG	Met ATG	Ser TCA 696
	Leu TTG	Arg CGG	Arg CGC 705	Asp GAC	Pro CCG	Met ATG 714	Ala GCG	Ala GCG	Ala GCC 723	Ala GCC	Gln CAG	Ile ATC 732	Ile ATC	Ile ATA	Val GTG 741	Ile ATC	Glu GAA	Glu GAG 750

5	Glu	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Thr	Thr	Val	Gly	Thr	Val	Gly	Gln	Leu	His	Val	Tyr
	GAA	GCA	AGA	CGA	ACA	GGG	ACA	ACG	GTC	GGT	ACT	GTA	GGA	CAG	TTG	CAT	GTA	TAT
			759			768			777			786			795			804
10	Pro	Gly	Gly	Ile	Asn	Val	Ile	Pro	Glu	Arg	Val	Glu	Phe	Val	Leu	Asp	Leu	Arg
	CCG	GGC	GGT	ATT	AAT	GTC	ATT	CCG	GAA	CGG	GTC	GAA	TTT	GTG	CTC	GAT	TTG	CGC
			813			822			831			840			849			858
15	Asp	Leu	Lys	Ala	Glu	Val	Arg	Asp	Gln	Val	Trp	Lys	Ala	Ile	Ala	Val	Arg	Ala
	GAC	TTG	AAG	GCT	GAG	GTG	CGC	GAT	CAA	GTA	TGG	AAA	GCC	ATA	GCC	GTG	CGG	GCA
			867			876			885			894			903			912
20	Glu	Thr	Ile	Ala	Lys	Glu	Arg	Asn	Val	Arg	Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu
	GAG	ACG	ATC	GCC	AAG	GAG	CGG	AAC	GTT	CGC	CTC	ACG	ACC	GAG	CGA	CTG	CAA	GAA
			921			930			939			948			957			966
25	Met	Ala	Pro	Val	Leu	Cys	Ser	Glu	Val	Val	Lys	Gln	Ala	Ala	Glu	Arg	Ala	Cys
	ATG	GCG	CCG	GTG	TTA	TGT	TCC	GAG	GTG	GTG	AAA	CAG	GCC	GCG	GAA	AGA	GCG	TGC
			975			984			993			1002			1011			1020
30	Lys	Gln	Leu	Gly	Tyr	Pro	Pro	Phe	Trp	Leu	Pro	Ser	Gly	Ala	Ala	His	Asp	Gly
	AAG	CAG	CTC	GGG	TAT	CCG	CCG	TTT	TGG	CTG	CCG	AGC	GGC	GCA	GCC	CAT	GAC	GGC
			1029			1038			1047			1056			1065			1074
35	Val	Gln	Leu	Ala	Pro	Ile	Cys	Pro	Ile	Gly	Met	Ile	Phe	Val	Arg	Ser	Gln	Asp
	GTA	CAG	TTG	GCT	CCG	ATT	TGC	CCG	ATC	GGG	ATG	ATT	TTT	GTC	CGC	TCC	CAA	GAC
			1083			1092			1101			1110			1119			1128
40	Gly	Val	Ser	His	Ser	Pro	Ala	Glu	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Asp	Cys	Ala	Val	Gly
	GGG	GTG	AGT	CAT	AGT	CCG	GCG	GAA	TGG	AGT	ACT	AAA	GAA	GAC	TGC	GCC	GTT	GGA
			1137			1146			1155			1164			1173			1182
45	Ala	Glu	Val	Leu	Tyr	His	Thr	Val	Trp	Gln	Leu	Ala	Gln	Gly	Glu	TER		
	GCA	GAG	GTG	CTT	TAT	CAT	ACA	GTG	TGG	CAA	CTG	GCC	CAA	GGG	GAA	TAA		
			1191			1200			1209			1218			1227			

REVENDICATIONS

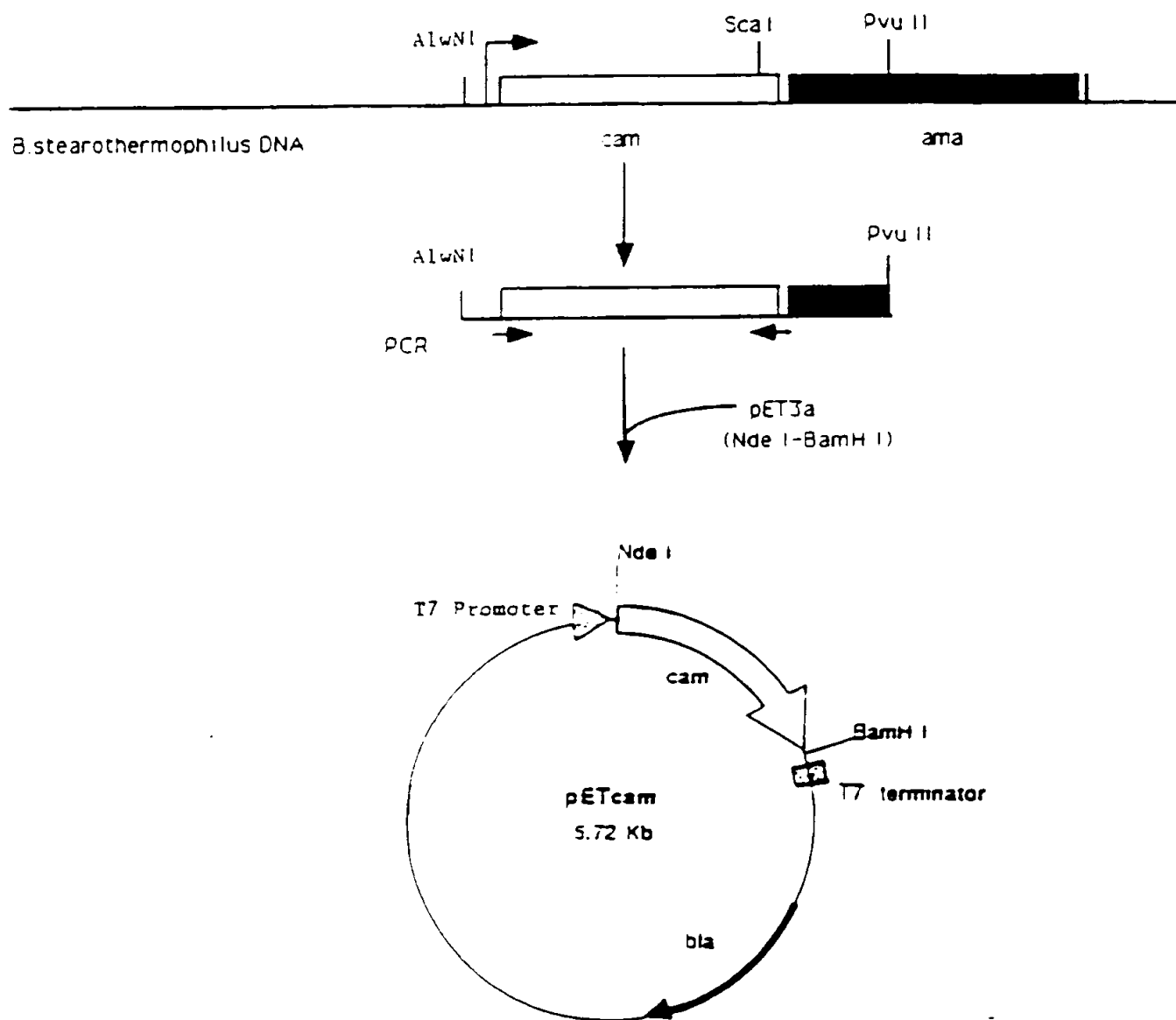
1. Acide aminé amidohydrolase possédant la séquence d'acides aminés représentée en SEQ ID N°1.
- 5 2. Acide aminé amidohydrolase caractérisée en ce qu'elle est issue de la souche *Bacillus stearothermophilus* NCIB8224 et est capable d'hydrolyser des dérivés N-carbamoyle acides aminés en L-acides aminés correspondants.
3. Séquence polynucléotidique caractérisée en ce qu'elle code pour une acide aminé amidohydrolase selon l'une des revendications 1 à 2.
- 10 4. Séquence selon la revendication 3 caractérisée en ce qu'il s'agit de la SEQ ID N°1.
5. ADN recombinant comprenant une séquence polynucléotidique selon la revendication 3 ou 4.
- 15 6. Vecteur d'expression à réplication autonome et/ou intégratif caractérisé en ce qu'il comprend une séquence polynucléotidique selon la revendication 3 ou 4.
7. Cellule recombinante contenant une séquence polynucléotidique selon la revendication 3 ou 4, un ADN recombinant selon la revendication 5 et/ou un vecteur d'expression selon la revendication 6.
- 20 8. Cellule selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'il s'agit de préférence d'une bactérie.
9. Procédé de production d'une acide aminé amidohydrolase selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon la revendication 7 ou 8 et l'on récupère l'acide aminé amidohydrolase attendue.
- 25 10. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que l'expression du gène ou de l'ADN recombinant codant pour l'acide aminé amidohydrolase est placée sous contrôle d'un promoteur T7 dans la dite cellule recombinante.

11. Procédé pour l'hydrolyse enzymatique de N-carbamoyl-L-acides aminés en L-acides aminés correspondants mettant en oeuvre une acide aminé amidohydrolase selon la revendication 1 ou 2 exprimée *in situ* ou non à partir d'une cellule selon la revendication 7 ou 8.

5 12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'hydrolyse est effectuée en présence d'une quantité efficace de sels de cobalt.

13. Utilisation d'une acide aminé amidohydrolase selon la revendication 1 ou 2. ou d'une séquence selon la revendication 3 ou 4 pour la production enzymatique de L-méthionine.

FIGURE 1/1



INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 508762

FR 9415838

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation de document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 11, 14 Mars 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 126432g, MUKOHARA, YUKUO ET AL. 'Molecular cloning and sequencing of the gene for a thermostable N-carbamyl-L-amino acid amidohydrolase from Bacillus stearothermophilus strain NS1122A' page 264; * abrégé *	1-9,11
D	& BIOSC., BIOTECHNOL., BIOCHEM., vol. 57, no. 11, 1993 pages 1935-1937, ---	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 11, 15 Mars 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 97136q, page 362; * abrégé *	1-9,11
	& JP-A-04 183 391 (NIPPON SODA) 30 Juin 1992 ---	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 19, 9 Mai 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 239858u, ISHIKAWA, TAKAHIRO ET AL. 'Microbial conversion of DL-5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids by Bacillus stearothermophilus NS1122A.' page 502; & BIOSCI., BIOTECHNOL., BIOCHEM., vol. 58, no. 2, 1994 pages 265-270, ---	1-9,11, 13

	-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
21 Septembre 1995		Delanghe, L
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un ou de plusieurs revendications ou arrière-plans technologiques généraux O : divulgation non écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie en principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>Δ : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

BPO FORM 150 6/92 (P4C13)

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREde la
PROPRIETE INDUSTRIELLEétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 508762
FR 9415838

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9252 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 92-428828 & JP-A-04 325 093 (NIPPON SODA CO) , 13 Novembre 1992 * abrégé *	1-9, 11
D,X	CHIMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 13, 28 Mars 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 157385y, SAKANYAN, V. ET AL 'Gene cloning, sequence analysis, purification and characterization of a thermostable aminoacylase from Bacillus stearothermophilus.' page 483; * abrégé * & APPL. ENVIRON. MICROBIOL., vol. 59, no. 11, 1993 pages 3878-3888,	1
A	FR-A-2 383 961 (SNAM PROGETTI) 13 Octobre 1978 * revendications *	1
A	EP-A-0 178 863 (SCHERING CORPORATION) 23 Avril 1986 * revendications *	10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 6)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
21 Septembre 1995		Delanghe, L
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un motif une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie en principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 (03/92) (P04C03)